

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

MÁRCIA FERNANDES DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA MUCOSA PERIIMPLANTAR EM PACIENTES COM
PERIIMPLANTITE: ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS**

UBERABA-MG
2013

MÁRCIA FERNANDES DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA MUCOSA PERIIMPLANTAR EM PACIENTES COM
PERIIMPLANTITE: ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Básica e Experimental”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sanívia
Aparecida de Lima Pereira

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

A69a Araújo, Márcia Fernandes de
Avaliação da mucosa periimplantar em pacientes com periim-
plantite: aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos / Márcia
Fernandes de Araujo. – 2012.
70 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2012.
Orientador: Profª Drª Sanívia Aparecida de Lima Pereira

1. Implantes dentários. 2. Periimplantite. 3. Inflamação. 4. Citoci-
nas. I. Pereira, Sanívia Aparecida de Lima. II. Universidade Federal
do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.314-089.843

MÁRCIA FERNANDES DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA MUCOSA PERIIMPLANTAR EM PACIENTES COM
PERIIMPLANTITE: ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Básica e Experimental”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

01 de Fevereiro de 2013

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Sanívia Aparecida de Lima Pereira – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Luís Henrique Borges
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Renes de Resende Machado
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho a minha família, particularmente a meus pais Elita e Joaquim (*in memoriam*), a meu marido Clidenor e a meu querido filho Davi.

AGRADECIMENTO

Expresso aqui minha sincera gratidão:

A Deus, por minha vida, por minha saúde e por colocar em meu caminho pessoas que me ajudaram nessa caminhada.

A meus pais, Elita e Joaquim (*in memoriam*), pelo amor, pela companhia e pelo exemplo inestimáveis que sempre me proporcionaram e que certamente me ajudaram em todos os sentidos da minha vida.

A meus irmãos, especialmente à Telma e à Delma, que, mesmo à distância, me ajudaram a suportar as dificuldades em morar sozinha em Uberaba.

Ao meu marido Clidenor, que sempre esteve ao meu lado nos momentos felizes e me auxiliou nos momentos difíceis, quando achei que não iria aguentar. Mas o agradeço especialmente por ter me dado o maior presente de minha vida, nosso filho Davi.

À minha orientadora Sanívia, pelo convite para ser sua orientada, pela confiança em mim depositada, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis e por seu exemplo de professora, pesquisadora e mulher.

A todos os professores da pós-graduação, por sua dedicação e empenho em cultivar nos alunos o desejo pela pesquisa e pela docência.

Aos demais alunos da pós-graduação que me acompanharam nas disciplinas e muitos dos quais se tornaram meus amigos.

À Polyanna, carinhosamente chamada por mim de Poly, colaboradora do CEFORES que muito me ensinou e que me motiva sempre com seu otimismo e alegria de viver.

Aos técnicos da UNIUBE, Cristiane, Andréa, Guilherme e Raiane, por sua atenção e inestimável ajuda no processamento de nosso material.

Aos meus demais amigos, pelo carinho e por torcerem por minhas realizações e por minha felicidade.

Às pessoas que participaram como colaboradores do projeto e especialmente às que foram voluntárias nesta pesquisa e que, assim, contribuíram para o desenvolvimento da ciência e para a promoção da saúde.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, que é fruto de muito esforço.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado graças aos auxílios financeiros recebidos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), da Universidade de Uberaba (UNIUBE), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

A periimplantite é uma lesão que circunda os implantes dentários devido a fatores como esforços mecânicos excessivos, corrosão e presença de bactérias agressivas, podendo provocar infecção e inflamação, além de perda óssea em torno dos implantes osseointegrados. **Objetivo** – O objetivo deste trabalho foi comparar a resposta inflamatória na mucosa periimplantar entre pacientes com periimplantite (CP) e pacientes sem periimplantite (SP). **Material e Métodos** – Foi realizada biópsia da mucosa periimplantar de 18 pacientes: nove do grupo CP e nove do grupo SP. Em cada caso, foram coletados e processados dois fragmentos. Foram realizados cortes seriados para análise histopatológica e imuno-histoquímica. Um dos fragmentos foi destinado para análise histopatológica, utilizando as colorações de hematoxilina-eosina e picro-sírius para quantificar a densidade de células inflamatórias e fibras colágenas, respectivamente. A análise imuno-histoquímica foi realizada para TGF- β , IL-17, CD31, mastócito-quimase e mastócito-triptase. O outro fragmento foi utilizado para quantificar a expressão de IL-13 por imunoenensaio enzimático (ELISA). **Resultados** – A densidade de células imunomarcadas para TGF- β e IL-17 e a densidade de vasos imunomarcados para CD31 foi significativamente maior no grupo CP quando comparado ao grupo SP. O grupo CP apresentou maior densidade de leucócitos, mastócito-quimase e mastócito-triptase, embora sem diferença significativa. Os pacientes do grupo SP apresentaram maior expressão de IL-13 e maior quantidade de fibras colágenas quando comparados aos pacientes do grupo CP, com diferença significativa. Nenhum dos pacientes apresentou supuração ou necrose. No grupo CP, houve correlação positiva e significativa entre a densidade de mastócito-triptase e a densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31. Houve também no grupo CP correlação positiva e significativa entre a densidade de mastócito-quimase e a densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31. Houve correlação negativa e significativa entre a densidade de IL-17 e a porcentagem de colágeno também no grupo CP. **Conclusões** – A maior resposta inflamatória no grupo CP sugere a participação de mastócitos-triptase e mastócito-quimase na indução de alterações nas células endoteliais e maior expressão de CD31. Essa indução faz com que ocorra maior exsudação de leucócitos, o que aumentaria outras citocinas como a IL-17, que por

sua vez agravaria o processo inflamatório e inibiria a atuação de IL-13. Com a redução de IL-13 no grupo CP, a ação pró-fibrótica neste grupo também estaria reduzida. Além disso, o aumento da IL-17 poderia ativar osteoclastos com a consequente perda de osso, o que poderia provocar a perda de implantes dentários. Dessa forma, com o estudo da influência de citocinas na periimplantite, novas terapias poderiam ser desenvolvidas, contribuindo assim com o aumento da longevidade do implante.

Palavras-chaves: Implantes dentários. Periimplantite. Inflamação. Citocinas.

ABSTRACT

The periimplantitis is a lesion surrounding dental implants due to factors such as excessive mechanical stress, corrosion and aggressive bacteria, which can cause infection and inflammation, and bone loss around dental implants. **Objective** – The aim of this study was to compare the inflammatory response in peri-implant gingival tissue between the group of patients with peri-implantitis (PP) and group with healthy healthy peri-implant tissues (HP). **Material e Methods** – Biopsy was performed of peri-implant mucosa of 18 patients: nine of PP group and nine of HP group. In each case two fragments were collected and serial sections were performed for histological and immunohistochemical analysis. One of the fragments was collected for the histopathological analysis, with use of hematoxylin-eosin (HE) and picro-sírius to quantify the density of inflammatory cells and collagen fibers respectively. Immunohistochemical analysis was performed to TGF- β , IL-17, CD31, mast cell chymase, and mast cell tryptase. The other fragment was used to quantify the expression of IL-13 by Enzymatic Immunoabsorbent Assay (ELISA). **Results** – Immunostained cell density for TGF- β , IL-17 and CD31 was significantly higher in PP group when compared with HP group. PP group showed greater density of red cells, leukocytes, mast cells chymase and mast cell tryptase, however, without significant difference. HP group patients showed higher IL-13 expression and increased amount of collagen fibers when compared with PP group patients, with significant difference. None of the patients presented suppuration or necrosis. There was significant positive correlation between the mast cell tryptase density and density of blood vessels immunostained with anti-CD31 in the PP group. There was significant positive correlation between the mast cell chymase density and density of blood vessels immunostained with anti-CD31 in the PP group. There was significant negative correlation between the density of IL-17 and collagen. **Conclusions** - This study demonstrated that in patients with peri-implantitis there was an increase in TGF- β and IL-17, indicating that these cytokines are directly involved in the inflammatory process. In addition, it demonstrated that there was an increase in IL-13 in patients with health peri-implant tissues, which could explain the larger number of collagen fibers in this group, suggesting that this cytokine has anti-nflamatory action. Thus, understanding the influence of cytokines in the peri-implantitis installation, new therapies could be developed in order to inhibit the synthesis of IL-17 and induce synthesis of IL-13 in peri-implant tissue, contributing to increase the longevity of the implant.

Keywords: Dental implants. Periimplantitis. Inflammation. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de um implante dentário osseointegrado e sua analogia com o dente natural.	18
Figura 2 – Esquema mostrando as diferenças entre tecido periodontal (A) e tecido periimplantar (B).....	20
Figura 3 – Exame clínico periimplantar na região do segundo pré-molar inferior esquerdo em paciente com periimplantite	33
Figura 4 – Sonda periodontal utilizada para sondagem periimplantar.....	33
Figura 5 – Exame radiográfico periapical na região de pré-molares inferiores esquerdos em paciente com periimplantite evidenciando exposição das roscas do implante.....	34
Figura 6 – Paciente com diagnóstico de periimplantite (A) e coleta do fragmento na região do primeiro pré-molar inferior esquerdo (B).....	35
Figura 7 – Cortes histológicos da mucosa periimplantar de paciente do grupo CP, corados por HE	36
Figura 8 – Corte histológico de mucosa periimplantar de paciente do grupo SP, corado por picro-sírius, onde são observadas fibras colágenas com birrefringência.....	37
Figura 9 – Reação imuno-histoquímica nos cortes histológicos da mucosa periimplantar de pacientes do grupo CP	39
Figura 10 – Densidade de leucócitos exsudados nos grupos CP e SP	43
Figura 11 – Densidade de mastócitos imunomarcados por anti-quimase nos grupos CP e SP	43
Figura 12 – Densidade de mastócitos imunomarcados por anti-triptase nos grupos CP e SP	44
Figura 13 – Densidade de vasos sanguíneos imunomarcados por anti-CD31 nos grupos CP e SP.....	44

Figura 14 – Densidade de leucócitos imunomarcados por IL-17 nos grupos CP e SP	45
Figura 15 – Densidade de leucócitos imunomarcados por anti- TGF- β nos grupos CP e SP	46
Figura 16 – Níveis da citocina IL-13 nos grupos CP e SP.....	46
Figura 17 – Porcentagem de fibras colágenas nos grupos CP e SP.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas e dados clínicos de pacientes do grupo com periimplantite (CP) e do grupo sem periimplantite (SP)	42
Tabela 2 – Coeficientes de correlação (valores reais) para periimplantite: IL-17, IL-13, CD31, mastócito-quimase, mastócito-triptase e fibras colágenas	48

LISTA DE SIGLAS

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albumina sérica bovina
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
COX	Ciclooxigenase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CP	Pacientes com periimplantite
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	<i>Enzymatic immunosorbent assay</i> – Imunoensaio enzimático
HE	Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> – Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon-gama
M	Molar
MG	Minas Gerais
ml	Mililitro
mm	Milímetro
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> – Solução salina tamponada
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> – Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PGE	Prostaglandina E
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (Ativador do Ligante kappa-B Fator Nuclear)
SP	Pacientes sem peri-implantite
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante -beta
Th	T helper
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
Treg	T regulador
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UNIUBE	Universidade de Uberaba
μ l	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 IMPLANTES DENTÁRIOS E TECIDOS PERIIMPLANTARES	18
1.2 PERIIMPLANTITE	22
1.3 CITOCINAS E PERIIMPLANTITE	23
2 HIPÓTESE	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES	32
4.2 COLETA DOS FRAGMENTOS	34
4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA	35
4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE FIBRAS COLÁGENAS	36
4.5 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	37
4.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	39
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE	63
ANEXOS	69

INTRODUÇÃO

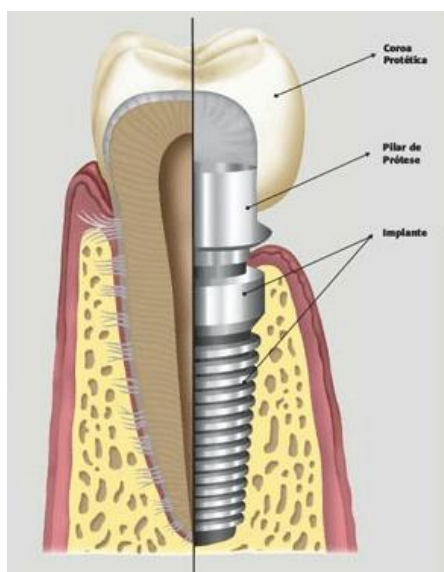
1 INTRODUÇÃO

1.1 IMPLANTES DENTÁRIOS E TECIDOS PERIIMPLANTARES

A perda de dentes pode contribuir negativamente na qualidade de vida das pessoas, principalmente quando afeta o bem-estar e a aparência (SAINTRAIN e DE SOUZA, 2012). A reabilitação oral utilizando implantes dentários é uma técnica com resultados satisfatórios, indicada para reabilitar espaços decorrentes de ausências dentais parciais ou totais (SÁNCHEZ-GARCÉS; GAY-ESCODA, 2004). Quando corretamente indicados e realizados, os implantes dentários proporcionam bom prognóstico, permitindo uma melhoria das funções mastigatórias e fonéticas além de promover melhor estética quando comparado às próteses convencionais (SALLUM et al., 2008).

Os implantes são constituídos por um parafuso metálico e um pilar, e sobre eles confeccionada uma coroa protética análoga à coroa dentária (PETKOVIC-CURCIN et al., 2011). Em conjunto, os componentes parafuso e pilar representam uma analogia da raiz dentária (PETKOVIC-CURCIN et al., 2011) (Figura 1).

Figura 1 – Esquema de um implante dentário osseointegrado e sua analogia com o dente natural.



Fonte: <http://www.renaissance.odo.br/procedimentos-em-implantes-dentarios>

1 Por sua biocompatibilidade, o titânio é o material de escolha para o parafuso
2 nos implantes dentários, fornecendo uma superfície para cicatrização celular e
3 epitelial, processo que ocorre geralmente entre 3 e 4 meses na mandíbula e entre 5
4 e 6 meses na maxila (LINDHE et al., 2010). Já para os pilares dos implantes os
5 materiais mais adequados são o titânio e a zircônia, por possuírem superfície mais
6 lisa e assim o potencial de colonização por bactérias é menor (HAUSER-
7 GERSPACH et al., 2011).

8 O sucesso dos implantes está diretamente relacionado à obtenção e
9 estabilidade da osseointegração, definida como a união estrutural e funcional direta
10 entre osso organizado e a superfície de um implante com carga (CARRANZA, 1997).

11 O tecido ósseo é um tecido mineralizado e dinâmico continuamente
12 remodelado por reabsorção e formação óssea (GARTNER e HIATT, 2003). As
13 células responsáveis pela formação, destruição e remodelação óssea são,
14 respectivamente, os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos. Os osteoblastos
15 provenientes de células osteoprogenitoras encarregam-se da síntese dos compostos
16 orgânicos da matriz óssea, inclusive do colágeno, das proteoglicanas e
17 glicoproteínas. Os osteócitos são células ósseas maduras, derivadas dos
18 osteoblastos, que residem em lacunas dentro da matriz, e secretam substâncias
19 necessárias para a manutenção do osso. Os osteoclastos são células derivadas de
20 progenitores granulócitos macrófagos e desempenham papel na reabsorção óssea
21 (GARTNER e HIATT, 2003).

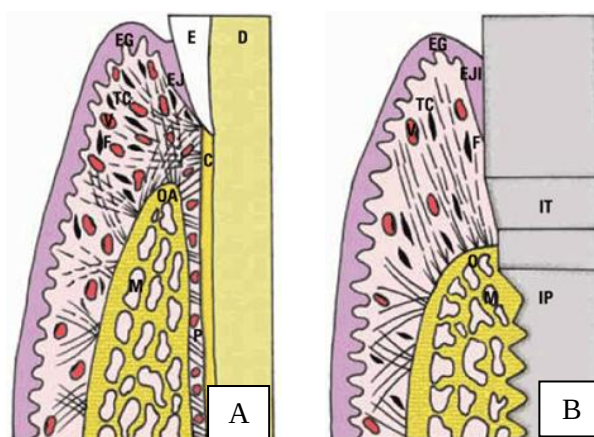
22 Para que um implante possa ser considerado bem sucedido, alguns critérios
23 devem ser observados e incluem: imobilidade individual do implante quando testado
24 clinicamente, ausência de evidência radiográfica de radiolusência periimplantar,
25 ausência de inflamação gengival ou mucosite peri-implantar, ausência de sinais de
26 infecção e dor, ausência de danos ao dente adjacente e sobrevida funcional de 90%
27 após cinco anos e de 85% após 10 anos de instalação (MISCH et al., 2008).

28 Além da osseointegração, o selamento biológico proporcionado pela mucosa
29 periimplantar ao redor dos implantes é de fundamental importância para a saúde
30 periimplantar (YEUNG, 2008). O selamento biológico representa barreira contra
31 penetração de patógenos químicos e substâncias bacterianas (YEUNG, 2008).

32 A mucosa periimplantar apresenta duas faces, uma externa e uma interna. A
33 face externa está voltada para a cavidade oral e é revestida por epitélio estratificado
34 pavimentoso queratinizado, e a face interna é revestida por epitélio estratificado não

queratinizado que constitui a junção implante-epitélio (LINDHE et al., 2010). Apesar da mucosa periimplantar apresentar semelhanças com a mucosa periodontal, estudos tem sugerido que o selamento biológico é menor no periimplante quando comparado ao dente natural (ATSUTA et al., 2005). Isto pode ocorrer devido às diferenças observadas no periimplante, como a ausência de cimento e ligamento periodontal na região periimplantar, e a orientação das fibras colágenas no tecido mole periimplantar, as quais se encontram paralelas ou oblíquas ao implante, não estando inseridas à superfície do implante como ocorre no dente natural, onde as fibras colágenas se inserem ao cimento de forma perpendicular (TETÈ et al., 2009) (Figura 2). Essas diferenças tornam o selamento biológico no periimplante uma barreira menos eficiente em comparação com o selamento apresentado pelo periodonto.

Figura 2 – Esquema mostrando as diferenças entre tecido periodontal (A) e tecido periimplantar (B).



A. (E) esmalte; (D) dentina; (C) cimento; (EG) epitélio gengival; (EJ) epitélio juncional; (TC) tecido conjuntivo; (OA) osso alveolar; F – fibroblasto; M – medula; IP – implante. **B.** (IT) intermediário; (IP) implante; (EJI) epitélio juncional implantar.

Fonte: CONSOLARO et al., 2010.

A margem entre o limite periimplantar e o limite da prótese representa a porta de entrada para bactérias e suas toxinas (COSYN et al., 2011). Quando o biofilme se acumula na superfície do implante, o tecido conjuntivo subepitelial é infiltrado por grande número de células inflamatórias e o epitélio torna-se ulcerado, ocorrendo perda de aderência e quebra do selamento biológico local com início de processo inflamatório decorrente do desequilíbrio entre a agressão do

1 microrganismo e a defesa do hospedeiro (REZENDE et al., 2005). Quando o biofilme
2 continua a migrar em direção apical, aparecem os sinais clínicos e radiográficos de
3 destruição do tecido, principalmente por degradação de colágeno e reabsorção
4 óssea, devido à presença de enzimas proteolíticas e células osteoclásticas, eventos
5 biológicos necessários para a migração das células de defesa ao local da lesão
6 (SALLUM et al., 2008). Essa resposta é semelhante ao que ocorre em dentes
7 naturais, entretanto o tamanho da lesão inflamatória de tecido mole e a perda óssea
8 resultante são maiores ao redor dos implantes do que em volta dos dentes, o que
9 acaba por gerar implicações mais sérias do que a inflamação marginal nos dentes
10 naturais (LINDHE et al., 2010).

11 Assim, um implante bem sucedido ocorre quando se obtém a
12 osseointegração e quando se estabelece um eficiente selamento biológico da
13 mucosa periimplantar (CARRANZA, 1997). Falhas na osseointegração ou no
14 selamento biológico podem levar à perda de implantes nas fases iniciais (fase de
15 cicatrização) bem como nas fases finais, isto é, após a osseointegração e colocação
16 da prótese (LISKMANN et al., 2006). Nas fases finais a perda de implantes
17 geralmente ocorre devido à reação inflamatória nos tecidos moles e tecido ósseo ao
18 redor dos implantes (SÁNCHEZ-GARCÉS; GAY-ESCODA, 2004; DUARTE et al.,
19 2009; HEASMAN et al., 2010).

20 A reação inflamatória nos tecidos moles, denominada mucosite
21 periimplantar, é a principal complicação registrada na literatura e está associada
22 frequentemente com a dificuldade de realização de correta higiene oral (REAL-
23 OSUNA et al., 2012). Esta condição afeta mais de 60% dos pacientes portadores de
24 implantes dentários e, embora seja mais prevalente, a mucosite periimplantar é mais
25 facilmente controlada que a periimplantite, a qual é responsável pelas maiores
26 causas de taxas de insucesso e o principal determinante das perdas dos implantes
27 (OPPERMANN et al., 2008). A mucosite periimplantar afeta apenas a mucosa e tem
28 caráter reversível, já a periimplantite apresenta caráter irreversível, sendo
29 caracterizada por reabsorção óssea além da inflamação na mucosa. Estudos
30 relatam que a prevalência da periimplantite varia entre 0% e 14,4% (BERGLUND et
31 al., 2002), entretanto estudos mais recentes relatam que a possibilidade dos
32 pacientes com implantes dentários apresentarem periimplantite, de cinco a dez anos
33 após a instalação do implante, varia de 16% a 28% (FRANSSON et al., 2010).

1.2 PERIIMPLANTITE

A periimplantite é definida como uma lesão inflamatória crônica de etiologia bacteriana caracterizada por inflamação da mucosa e perda de suporte ósseo (CHARALAMPAKIS et al., 2012).

Apesar da perda óssea ao redor dos implantes osseointegrados também poder ser atribuída a fatores mecânicos, como distribuição incorreta dos implantes e da carga sobre os mesmos, comprimento do *cantilever*, tipo de próteses ou até mesmo fraturas dos componentes protéticos, a infecção bacteriana manifestada na periimplantite é uma das principais causas da perda óssea periimplantar, podendo levar ao comprometimento total da osseointegração e conseqüente perda do implante (CHARALAMPAKIS et al., 2012).

Na periimplantite, assim como na periodontite, há presença de um biofilme rico em bactérias gram-negativas, especialmente *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermédia*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythenses* (SHIBLI et al., 2008). O desequilíbrio entre a presença de microrganismos e a resposta do hospedeiro faz com que se instalem tanto as lesões periodontais quanto as lesões periimplantares (ZITZMANN; BERGLUNDH, 2008).

Clinicamente, a periimplantite é caracterizada pela formação de bolsa periimplantar com profundidade acima de 3mm, além de sangramento à sondagem e/ou supuração. Radiograficamente, a periimplantite é diagnosticada pela visualização de perda óssea ao redor do implante, representada por radioluscência periimplantar devido à perda de suporte ósseo (SÁNCHEZ-GARCÉS; GAY-ESCODA, 2004; HEITZ-MAYFIELD, 2008).

Além da microbiota dominante, outra semelhança das lesões periimplantares com as periodontais é a presença mais frequente de células T, o que sugere que a resposta imune local também é regulada por estas células (BULLON et al., 2004). Este fato marca o processo de defesa periimplantar como uma resposta imunológica mediada por células, com características identificadoras do antígeno, estimuladora da produção e liberação de citocinas, que resultam na inibição ou até destruição do antígeno; ações estas responsáveis pelo processo inflamatório e lesões teciduais (SALLUM et al., 2008; ABBAS et al., 2008).

1.3 CITOCINAS E PERIIMPLANTITE

As citocinas são moléculas proteicas que enviam sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico (ABBAS et al., 2008). A lesão cirúrgica, em decorrência da inserção do implante, desencadeia resposta inflamatória aguda, na qual inúmeras citocinas e fatores de crescimento servem de mediadores, que podem promover regeneração ou reparo.

No entanto, com a infecção periimplantar ocorre perpetuação da resposta inflamatória com produção acentuada de citocinas e quimiocinas pelos macrófagos ativados, principalmente do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1), além de mediadores inflamatórios liberados principalmente por mastócitos durante a fase inicial da inflamação. Essa ativação provoca alterações nos vasos sanguíneos locais, como aumento do diâmetro vascular, ativação das células endoteliais com expressão de moléculas de adesão celular e aumento da permeabilidade vascular, causando o edema e a saída de proteínas plasmáticas que auxiliam na defesa do hospedeiro (MURPHY et al., 2010).

Durante a resposta inflamatória, a indução de moléculas de adesão nas células endoteliais recruta grande número de leucócitos circulantes para o local da infecção. A migração dos leucócitos para fora dos vasos ocorre devido à expressão de moléculas de adesão leucocitárias como selectinas e integrinas e de moléculas de adesão endoteliais como ICAM e PECAM, também conhecida como CD31. Sendo assim, a expressão de CD31 nas células endoteliais pode ser utilizada para determinar a densidade de vasos sanguíneos e angiogênese (YAMANAKA et al., 2012). As alterações induzidas na parede dos vasos sanguíneos, além de recrutarem neutrófilos e macrófagos, também permitem que linfócitos T efetores recém-ativados entrem no tecido infectado (MURPHY et al. 2010).

Outra forma de indução da resposta inflamatória é por meio da ativação da cascata do sistema complemento (AMIN, 2012). O predomínio de uma microbiota anaeróbia gram-negativa no tecido periimplantar favorece a produção de endotoxinas e lipopolissacarídeos, que ativam o sistema complemento pela via alternativa, produzindo peptídeos quimiotáticos como o C5a (MÁRTON et al., 1998). O peptídeo C5a além de aumentar a permeabilidade vascular e induzir a expressão de algumas moléculas de adesão, atua como um potente quimioatraente de neutrófilos e monócitos e também ativa fagócitos e mastócitos locais, os quais, por

sua vez, são estimulados e liberam grânulos contendo histamina e citocina TNF- α (MURPHY et al., 2010). Além da histamina e TNF- α , os mastócitos ativados podem sintetizar fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e várias citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-3 e IFN- γ (CHATTERJEE et al., 2008). Além disso, essas células são uma rica fonte de enzimas proteolíticas como triptase e quimase, as quais podem ativar as metaloproteinases, que por sua vez degradam as proteínas da matriz tecidual, causando destruição dos tecidos. Dessa forma, os mastócitos atuam exercendo função pró-inflamatória (AMIN, 2012).

Essa capacidade de degranulação e de produção de diversas substâncias faz com que os mastócitos participem dos eventos associados à inflamação, à reabsorção óssea e à interação com outras células do sistema imune (NETTO et al., 2012). A respeito das interações entre mastócitos e células T, verifica-se que os mastócitos podem secretar citocinas, influenciando na diferenciação das células T nas respostas tipo Th1 e Th2, sendo capazes de modular a proliferação e a produção de citocinas nas respostas de células T CD8 (RODINI et al., 2004).

A diferenciação das células T CD4 virgens nas distintas populações de células T efectoras CD4 – Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg) – ocorre durante a progressão de uma infecção e depende dos efeitos da infecção nas células apresentadoras de antígeno (STOCKINGER; VELDHOFEN, 2007).

As células Th1 e Th2 são as células T CD4 efectoras mais estudadas durante a resposta imune, com cada subconjunto caracterizado através da transcrição distinta do fator de ativação e citocinas secretadoras de fenótipo. A resposta imune à infecção é regulada pelo equilíbrio entre citocinas pró e antiinflamatórias (CHAPLIN, 2006; MEDZHITOV, 2007).

As células Th1 secretam as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ , possuindo um papel pró-inflamatório com resposta imune mediada por células contra bactérias intracelulares, vírus e células tumorais, através da ativação de macrófagos e células T citotóxicas (MOSMANN; COFFMAN, 1989).

Já as células Th2 secretam principalmente IL-4, IL-5 e IL-13, que estimulam a resposta imune humoral e induzem aumento na resistência contra os microorganismos extracelulares, apresentando assim ação antiinflamatória (MOSMANN; COFFMAN, 1989; KUMAR, et al., 2011). A IL-13 inibe a atividade quimiotática e fagocitária de monócitos/macrófagos, reduz expressão de citocinas

1 pró-inflamatórias e quimiocinas, atuando assim na diminuição da resposta
2 inflamatória (ZURAWKI; VRIES, 1994). Na reparação tecidual, a IL-13 promove
3 fibrose ao estimular fibroblastos e macrófagos a sintetizarem colágeno. Essa fibrose
4 relacionada ao aumento de IL-13 parece ser importante na patogênese de
5 desordens fibróticas (FUSCHIOTTI, 2011). Estudos que analisam a relação de IL-13
6 na patogênese da periodontite são escassos e nada se sabe até agora sobre os
7 mecanismos desta citocina nessa doença (GONZALLES et al., 2011). Até o
8 momento não existem relatos desta citocina na periimplantite.

9 Apesar das células Th1 e Th2 serem as mais estudadas, a primeira
10 subpopulação de células T efectoras a ser gerada em resposta à infecção é
11 frequentemente as células Th17 (MURPHY et al., 2010). As células Th17 deixam o
12 linfonodo e migram para pontos infecciosos distantes, onde são estimuladas a
13 sintetizarem e a liberarem citocinas, que incluem vários membros da família IL-17. A
14 IL-17 induz estas células a secretarem várias citocinas, incluindo a IL-6 e
15 quimiocinas como a IL-8. Assim, uma importante ação da IL-17 nos locais de
16 infecção é induzir células locais a secretarem citocinas e quimiocinas que atraem
17 neutrófilos e assim amplificar a resposta inflamatória pelo sistema imune inato nos
18 locais recém-infectados (MURPHY et al., 2010).

19 A IL-17 desenvolve importante papel na iniciação ou manutenção da
20 resposta pró-inflamatória induzindo reabsorção osteoclástica. Atua em osteoblastos
21 induzindo a síntese de COX-2 mediada por PGE2 e a expressão de RANKL que
22 induz a diferenciação de osteoclastos progenitores em osteoclastos maduros pela
23 ligação ao receptor para RANKL presente no osteoclasto progenitor (KOTAKE et al.,
24 1999). A IL-17 é sintetizada a partir da indução de IL-6 juntamente com o TGF- β
25 (MURPHY et al., 2010).

26 O TGF- β pode atuar tanto na destruição quanto na cicatrização (FAVA et al.,
27 1991). A presença de TGF- β em sítios com infecção e inflamação pode levar ao
28 recrutamento, à aderência e à atividade dos leucócitos, demonstrando apresentar
29 propriedades pró-inflamatórias, com quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e
30 linfócitos (LIN et al., 2000; SUAREZ et al., 2004). O TGF- β é um peptídeo
31 multifuncional envolvido no desenvolvimento embriológico, cicatrização de feridas,
32 progressão de tumores, inflamação e regulação imune (SKALERIC et al., 1997). Sua
33 principal fonte são as plaquetas, mas os monócitos/macrófagos, células endoteliais e
34 fibroblastos também liberam este fator de crescimento (BUDUNELI et al., 2001). O

1 TGF- β é uma citocina bem conhecida por seus efeitos potenciais no reparo,
2 regeneração e na regulação de metaloproteinases de matriz, as quais mediam o
3 colapso do tecido conjuntivo. Ele inibe a liberação de procollagenase e suprime a
4 produção de collagenase por fibroblastos e macrófagos (PAGE, 1991; ALPAGOT et
5 al., 2008). Além disso, ativa diretamente a expressão gênica para a síntese de
6 componentes da matriz extracelular, incluindo as proteínas colágenas (BUDUNELI et
7 al., 2001).

8 Sabendo do aumento crescente da instalação de implantes dentários nas
9 últimas décadas e que a periimplantite é uma doença inflamatória, se fazem
10 necessários novos estudos para melhor compreensão da patogênese do processo
11 inflamatório com a finalidade de contribuir para novas terapias que irão prevenir a
12 perda precoce do implante.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Por ser a periimplantite uma doença inflamatória, levantamos a hipótese de que nos pacientes com periimplantite exista aumento de células inflamatórias e de citocinas pró-inflamatórias, bem como de vasos sanguíneos. Por outro lado, por ser a periimplantite uma doença que cursa com a destruição do tecido periimplantar, levantamos a hipótese de que nos pacientes com periimplantite exista redução de citocinas anti-inflamatórias e de fibras colágenas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a resposta inflamatória na mucosa periimplantar entre pacientes com periimplantite e sem periimplantite.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Ao comparar a mucosa periimplantar de pacientes com e sem periimplantite, tivemos como objetivos avaliar:

- Intensidade de hemorragia.
- Densidade de leucócitos exsudados.
- Presença de necrose.
- Densidade de mastócitos-quimase e de mastócitos-triptase.
- Densidade de leucócitos imunomarcados por anti-IL-17 e anti-TGF- β .
- Níveis da citocina IL-13.
- Densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31.
- Porcentagem de colágeno.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

O presente estudo transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP/UFTM), Uberaba/MG, Brasil, sob o nº. 1657 (ANEXO A). Os pacientes foram selecionados durante consulta de acompanhamento dos implantes, no período de julho de 2010 a julho de 2011, em clínica odontológica da rede privada na cidade de Uberaba, Minas Gerais, Brasil. Foram obtidas informações médicas e odontológicas dos pacientes que concordaram participar do estudo e que atenderam aos critérios de inclusão/exclusão (APÊNDICE A). Os dados demográficos como a idade, o gênero e a etnia foram avaliados para obter uma distribuição homogênea entre os grupos (Tabela 1). Todos os pacientes elegíveis foram informados da natureza do estudo, os potenciais riscos e benefícios de sua participação no estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B). Foram utilizados 18 implantes de 18 pacientes, sendo nove incluídos no grupo com periimplantite (CP) e nove incluídos no grupo sem periimplantite (SP).

Todos os pacientes deveriam possuir pelo menos um implante na cavidade oral, em função há mais de seis meses. Para serem incluídos no grupo CP, os pacientes deveriam apresentar, em pelo menos um sítio do implante, sangramento marginal e profundidade de sondagem superior a 3mm, além de perda óssea identificada radiograficamente. Já no grupo SP a profundidade de sondagem deveria estar entre 0 e 3mm, sem a presença de sangramento marginal, supuração ou perda óssea. Apenas um implante de cada paciente foi incluído no estudo e, caso possuísse mais de um implante, aquele com maior grau de doença foi utilizado para a realização de biópsia. Nos casos onde todos os implantes eram saudáveis foi selecionado aquele mais próximo à linha média.

Os critérios de exclusão para a seleção dos pacientes foram os seguintes: realização de terapia periodontal ou periimplantar anterior, presença de doenças sistêmicas relevantes, uso de antibióticos ou anti-inflamatórios nos últimos seis meses, fumantes, gestantes, lactantes, implantes com mobilidade ou supuração e aqueles pacientes que não concordaram assinar o termo de consentimento.

Os seguintes parâmetros foram avaliados em seis sítios de cada implante (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual) (MENDONÇA et al., 2009) (Figura 3), utilizando uma sonda periodontal milimetrada PCPUNC-15BR (Hu-Friedy, São Paulo, Brasil) (Figura 4): (a) sangramento marginal – a presença ou ausência de sangramento foi registrada pela passagem da sonda periodontal ao longo da margem do tecido mole; (b) supuração – presença ou ausência de supuração espontânea ou à sondagem; (c) profundidade de sondagem – distância, em milímetros, entre a margem da mucosa até o fundo da sulco ou bolsa periimplantar.

Figura 3 – Exame clínico periimplantar na região do segundo pré-molar inferior esquerdo em paciente com periimplantite.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 4 – Sonda periodontal utilizada para sondagem periimplantar.



Fonte: Acervo pessoal

Logo após o exame clínico, foram obtidas radiografias intraorais periapicais para cada implante utilizando a técnica do paralelismo com posicionador radiográfico com o objetivo de avaliar a perda óssea periimplantar (Figura 5).

Figura 5 – Exame radiográfico periapical na região de pré-molares inferiores esquerdos em paciente com periimplantite evidenciando exposição das roscas do implante.



Fonte: Acervo pessoal.

Foi considerada como perda óssea periimplantar quando o implante apresentou exposição de mais de duas roscas.

O exame clínico e as tomadas radiográficas foram realizados pelo mesmo examinador (MLRM), devidamente treinado e calibrado.

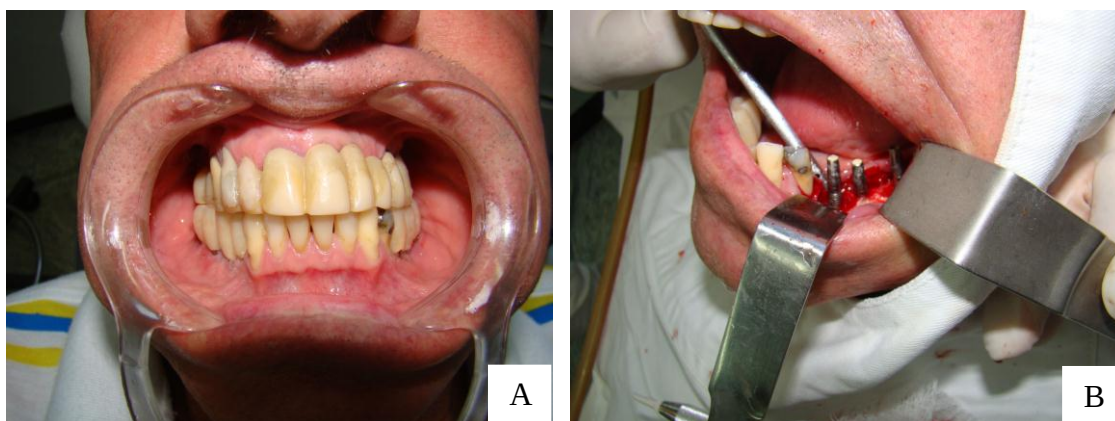
4.2 COLETA DOS FRAGMENTOS

Para a coleta dos fragmentos de gengiva, os pacientes foram submetidos a antissepsia extra-oral com solução de digluconato de clorexidina a 2% e intra-oral com bochecho de solução de digluconato de clorexidina a 0,12%. Posteriormente foi realizado bloqueio anestésico local e recolhido um fragmento de gengiva marginal. No grupo CP os fragmentos foram removidos do sítio com maior profundidade de sondagem e no grupo SP os fragmentos foram removidos da região lingual. Cada fragmento possuía dimensões aproximadas de 4x4mm (GUALINI; BERGLUND, 2003), sendo subdividido em duas partes, uma delas destinada para análise histopatológica e a outra para análise através de ensaio imunoenzimático (ELISA). (Figura 6).

O fragmento destinado à análise histopatológica foi imediatamente fixado em formaldeído 3,7%. O fragmento destinado ao ELISA foi colocado em tubo tipo *eppendorf* contendo 400µl de solução salina tamponada (PBS) com inibidor de

protease – *Phenylmethanesulfonyl-fluoride* – PMSF (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), macerado sob refrigeração em homogeneizador de tecidos (IKA, Apeldoorn, Holanda) e armazenado em congelador a -70°C até que todas as coletas fossem realizadas para então proceder o ensaio enzimático.

Figura 6 – Paciente com diagnóstico de periimplantite (A) e coleta do fragmento na região do primeiro pré-molar inferior esquerdo (B).



Fonte: Acervo pessoal.

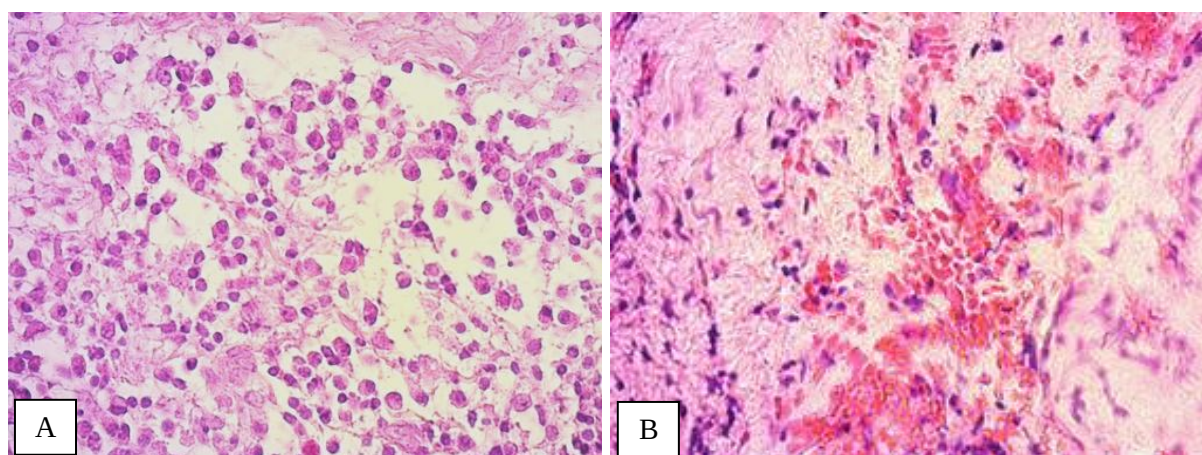
4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA

As amostras fixadas em formaldeído 3,7% por 24 horas foram desidratadas, incluídas em parafina e processadas para análise histopatológica. Cortes sagitais seriados de seis micrômetros foram montados em lâmina histológica e coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou com picro-sírius.

As lâminas coradas com HE foram utilizadas para identificar processos patológicos como hemorragia, inflamação e necrose. A análise das lâminas foi realizada utilizando-se microscópio de luz (BIOVAL, Valência, Espanha) e objetiva de 100x. Em cada caso foram analisados todos os campos de tecido epitelial e de tecido conjuntivo. Para a análise de inflamação foi avaliada a presença de leucócitos exsudados em todos os campos do corte histológico (Figura 7A). A área de cada campo, em micrômetros quadrados, foi calculada com o auxílio de uma ocular micrometrada, e a densidade de leucócitos exsudados foi expressa em número de leucócitos exsudados por milímetro quadrado. Para avaliação de hemorragia, os casos foram classificados como ausente (quando não havia hemácias fora do leito

vascular), discreta (menos de cinco campos com hemácias fora do leito vascular), moderada (entre cinco e dez campos com hemácias fora dos vasos sanguíneos) e acentuadagrave (acima de dez campos com hemácias fora dos vasos sanguíneos), sendo os resultados expressos em porcentagem (Figura 7B). Para identificar necrose observamos se houve perda da arquitetura tecidual, acidofilia citoplasmática e alterações nucleares, como picnose, cariorrexe ou cariólise.

Figura 7 – Cortes histológicos da mucosa periimplantar de paciente do grupo CP, corados por HE.

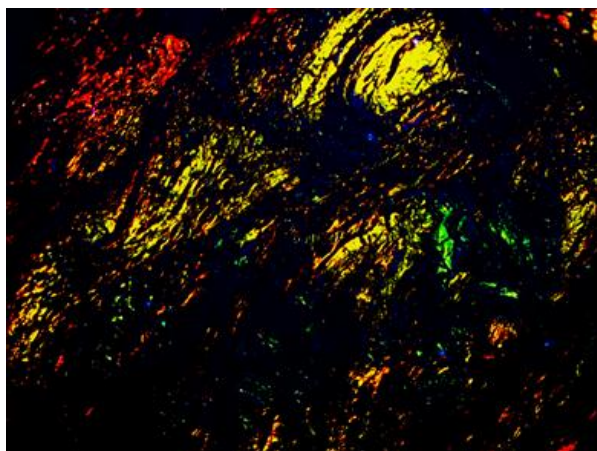


A. Leucócitos exsudados no tecido conjuntivo (HE, 1600x). **B.** Hemácias fora do leito vascular (HE, 1600x).

4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE FIBRAS COLÁGENAS

Para a quantificação morfométrica da fibrose foi utilizado um sistema de análise de imagem, constituído por um microscópio (Zeiss, Berlim, Alemanha), com câmara de captura de imagem AxioCam (Zeiss, Berlim, Alemanha) e um computador com o software Axiovision (KontronElektronik, Berlim, Alemanha). Para a avaliação morfométrica de fibras colágenas, as lâminas foram coradas com picro-sírius e polarizadas com filtro de luz. A imagem final foi aumentada 1.600x, com a imagem exibida no monitor do computador. A imagem polarizada das fibras colágenas mostrou birrefringência (Figura 8), sendo a porcentagem de colágeno quantificada automaticamente em cada campo. Foram avaliados todos os campos do tecido conjuntivo em cada caso. A densidade foi expressa em porcentagem de colágeno por área.

Figura 8 – Corte histológico de mucosa periimplantar de paciente do grupo SP, corado por picro-sírius, onde são observadas fibras colágenas com birrefringência.



Picro-sírius, 1600x

4.5 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes histológicos foram montados em lâminas pré-tratadas com 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Aldrich, St. Louis, MO., EUA) e utilizados para análise imuno-histoquímica de TGF- β , IL-17, CD31, mastócitos-quimase e mastócitos-triptase.

Para as reações imuno-histoquímicas, após desparafinização e reidratação, os cortes histológicos foram lavados com PBS 0,01 M, pH 7,2, durante cinco minutos à temperatura ambiente. A etapa seguinte foi a recuperação antigênica com calor úmido. As lâminas foram encubadas com PBS (TGF- β) e ácido cítrico (IL-17, CD31, mastócito-quimase e mastócito-triptase) durante 30 minutos. Para o bloqueio de ligações inespecíficas foi utilizado o PBS-BSA (Bovine Serum Albumin) 2% durante 30 minutos, a temperatura ambiente.

Os anticorpos foram diluídos em BSA nas seguintes concentrações: anti-TGF- β , 1:20 (R&D, Minnesota, EUA); anti-IL-17, 1:20 (R&D, Minnesota, EUA); anti-CD31, 1:50 (R&D, Minnesota, EUA); anti-quimase, 1:2.000 (Dako, Carpinteria, EUA); anti-triptase, 1:200 (Dako, Carpinteria, EUA). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário diluído por 18 horas (*overnight*) a 4° C.

No dia seguinte, os cortes foram lavados duas vezes com PBS e Tween20 0,05%. Os cortes foram tratados com metanol e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% durante 15 minutos para bloquear a peroxidase endógena dos tecidos. Para a

1 imunomarcção com anti-quimase e anti-triptase o bloqueio da peroxidase
2 endógena foi realizado antes da incubação do anticorpo primário. Para a detecção
3 dos anticorpos foi utilizada a técnica de Avidina-Biotina conjugada com peroxidase
4 (ABC) utilizando-se o Kit Lsab-plus (DAKO, Carpinteria, EUA). O complexo foi
5 incubado por 30 minutos, a temperatura ambiente.

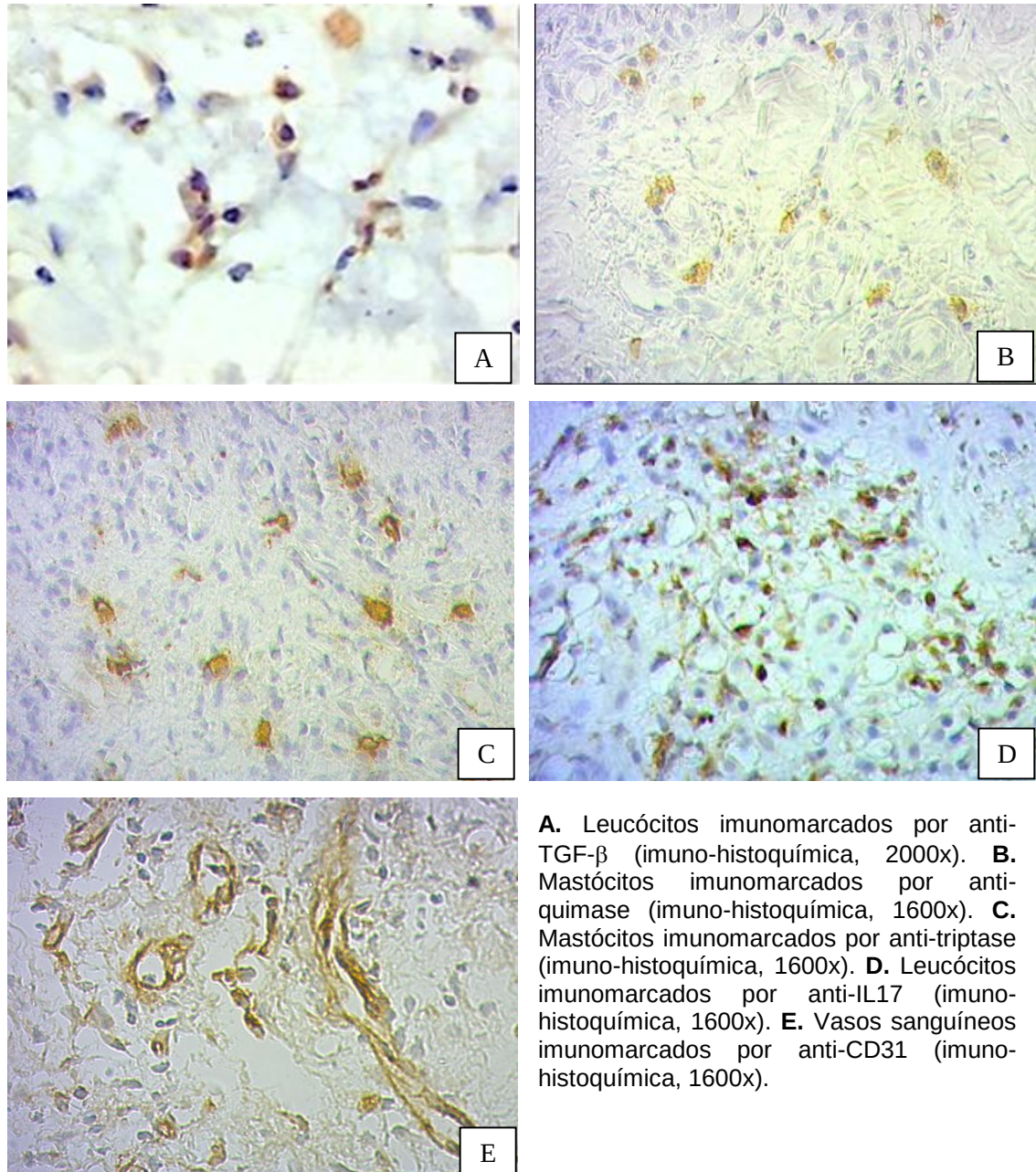
6 A reação imuno-histoquímica de cada anticorpo foi visualizada utilizando
7 solução cromógena de diaminobenzidina – DAB (Sigma Chemical CO, Missouri,
8 USA) e H_2O_2 , a qual foi aplicada e incubada durante sete minutos à temperatura
9 ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, os cortes foram lavados em água
10 destilada, contracolorados com hematoxilina de Harris e as lâminas montadas com
11 Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Os controles negativos foram obtidos por
12 omissão dos anticorpos primários.

13 Para a quantificação de células imunomarcadas por anti- TGF- β , anti-
14 quimase, anti-triptase, anti-IL-17 e de vasos imunomarcados por anti-CD31 foi
15 utilizado um microscópio de luz comum (Nova Optical Systems, Utah, USA), com
16 objetiva de 40x. As células imunomarcadas por anti-TGF- β (Figura 9A), anti-quimase
17 (Figura 9B), anti-triptase (Figura 9C), anti-IL-17 (Figura 9D) e os vasos
18 imunomarcados por anti-CD31 (Figura 9E) foram avaliados em todos os campos
19 com tecido conjuntivo. A área de cada campo, em micrômetros quadrados, foi
20 calculada com o auxílio de uma ocular micrometrada. Para TGF- β , mastócito-
21 quimase, mastócito-triptase e IL-17, a densidade foi expressa em número de células
22 por milímetro quadrado. Para CD31 a densidade foi expressa em número de vasos
23 imunomarcados por milímetro quadrado.

24

25

Figura 9 – Reação imuno-histoquímica nos cortes histológicos da mucosa periimplantar de pacientes do grupo CP.



4.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

O fragmento destinado para ELISA foi macerado em homogeneizador de tecidos (IKA, Apeldoorn, Holanda) e armazenado em tubo *ependorf* contendo 400 μ l de PBS e inibidor de protease PMSF e congelado a – 70° C.

Alíquotas de cada amostra foram analisadas por ELISA para determinação dos níveis de IL-13, de acordo com as recomendações do fabricante (eBioscience, Viena, Áustria). Sobre a placa pré-tratada com anticorpo foi adicionado 100µl da solução padrão e nos demais poços, foram adicionados 100µl da amostra diluída em *assay buffer* (1:2) de acordo com as recomendações do fabricante. Todos os poços receberam 50µl do conjugado. Em seguida, a placa foi incubada por duas horas à temperatura ambiente. Após esse período a placa foi lavada por mais três vezes com a solução de lavagem. Posteriormente, foram colocados nos poços da placa, 100µl de *Streptavidin* diluída na concentração de trabalho. Subsequentemente essa solução foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e a placa foi lavada por três vezes com a solução de lavagem. Foram então adicionados 100µl da solução de substrato nas proporções de 1:1 de H₂O₂ e *Tetramethylbenzidine* e realizada incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 50µl da solução de parada (H₂SO₄ 2N) e realizada a leitura das placas em um espectrofotômetro de microplacas automático (Microplate Reader/Model 3550, Bio Rad). A análise dos resultados do ELISA foi realizada às cegas.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o auxílio do *software* estatístico *GraphPad Prism* 5 (GraphPad, San Diego, California, USA), e o teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi utilizado para a avaliação da normalidade. Para comparação entre os dois grupos de variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste *t Student*. A comparação entre os dois grupos com distribuição não-normal foi realizada através do teste *Mann Whitney*. Para variáveis qualitativas (masculino/feminino; caucasiano/não caucasiano) foi utilizado o teste exato de *Fisher*. Para as correlações foi utilizado o *software* *BioEstat* 5.0 (Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, Brasil) e realizados os testes *Pearson* e *Spearman*, para distribuições normal e não-normal respectivamente. O nível de significância assumido foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Foram selecionados 18 implantes de 18 pacientes desdentados parciais, sendo nove pacientes com periimplantite (CP) e nove sem periimplantite (SP). Os dados demográficos dos grupos CP e SP foram: Caucasiano (7 *versus* 7) e não-Caucasiano (2 *versus* 2), gênero masculino (4 *versus* 4) e do gênero feminino (5 *versus* 5). A média e desvio padrão de idade foi de $64,00 \pm 2,85$ anos no grupo CP e $58,33 \pm 3,02$ anos no grupo SP. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à etnia, ao gênero e à idade entre os pacientes dos grupos CP e SP, demonstrando distribuição homogênea entre os dois grupos (Tabela 1).

Não houve sangramento marginal no grupo SP. No grupo CP houve sangramento marginal em todos os locais avaliados. O grupo CP apresentou maior média de profundidade de sondagem em comparação ao grupo SP, respectivamente 4,83mm *versus* 1,61mm ($p < 0,0001$). Nenhum dos grupos apresentou supuração ou mobilidade (Tabela 1).

Tabela 1 – Características demográficas e dados clínicos de pacientes do grupo com periimplantite (CP) e do grupo sem periimplantite (SP).

	CP (n = 9)	SP (n = 9)
Etnia ^a (C:NC)	7:2	7:2
Gênero ^b (M:F)	4:5	4:5
Idade ^c (anos, média $\pm$ SD)	$64,00 \pm 2,85$	$58,33 \pm 3,02$
Sangramento marginal	9	0
Supuração	0	0
Profundidade de sondagem (mm) ^d	$4,83 \pm 0,09^*$	$1,61 \pm 0,11^*$

C: Caucasiano; NC: Não-Caucasiano; M: Masculino; F: Feminino; SD: desvio padrão

^a teste exato de Fisher $p = 0,42$.

^b teste exato de Fisher $p = 1,00$.

^c Teste "t" Student $p = 0,19$.

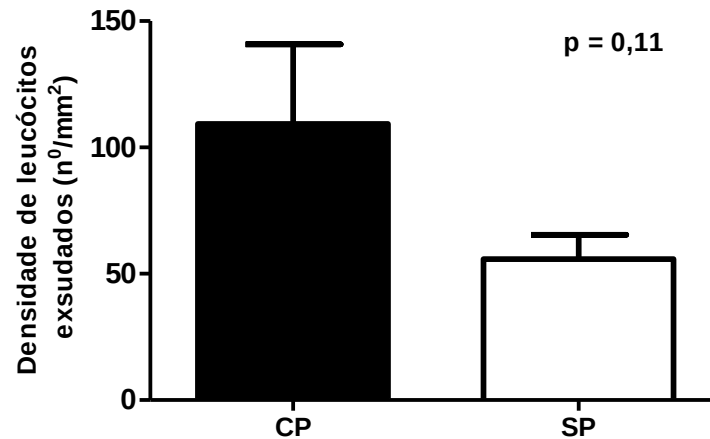
^d Teste *Mann Whitney* $p < 0,001$.

* Indica diferença significativa.

Nos grupos CP e SP a hemorragia foi respectivamente: ausente (0% *versus* 0%), discreta (11% *versus* 67%), moderada (33% *versus* 33%), acentuada (56% *versus* 0%).

O grupo CP apresentou maior densidade de leucócitos exsudados quando comparado ao grupo SP, embora sem diferença significativa ($p > 0,05$) (Figura 10).

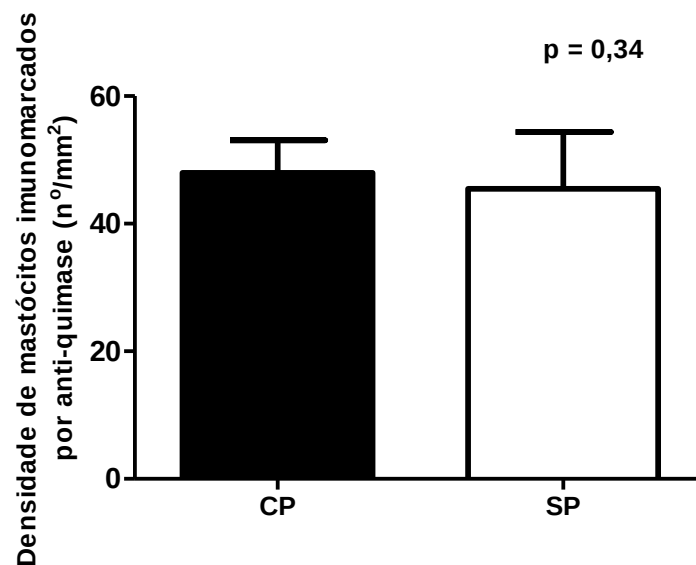
Figura 10 – Densidade de leucócitos exsudados nos grupos CP e SP.



Teste *t Student*; $p = 0,22$. Os valores foram expressos em nº de leucócitos por campo (nº/mm²)

O grupo CP apresentou maior densidade de mastócito-quimase quando comparado ao grupo SP, embora sem diferença significativa ($p > 0,05$) (Figura 11).

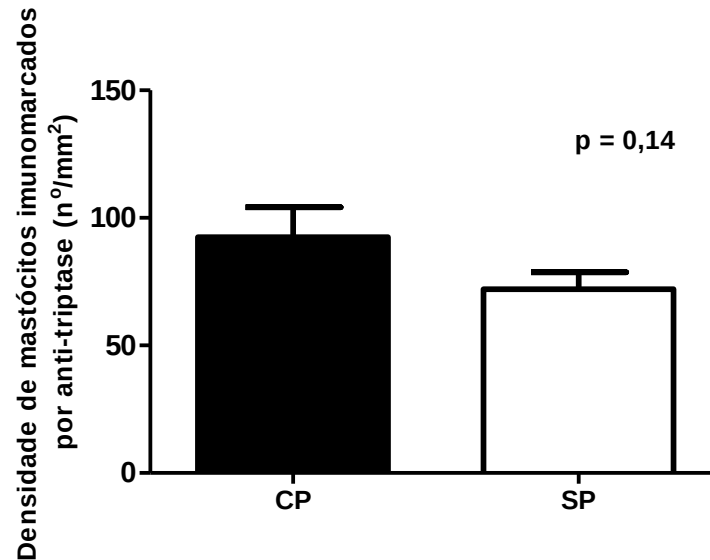
Figura 11 – Densidade de mastócitos imunomarcados por anti-quimase nos grupos CP e SP.



Teste *t Student*; $p = 0,81$. Os valores foram expressos em nº/mm².

O grupo CP apresentou maior densidade de mastócito-triptase quando comparado ao grupo SP, embora sem diferença significativa ($p > 0,05$) (Figura 12).

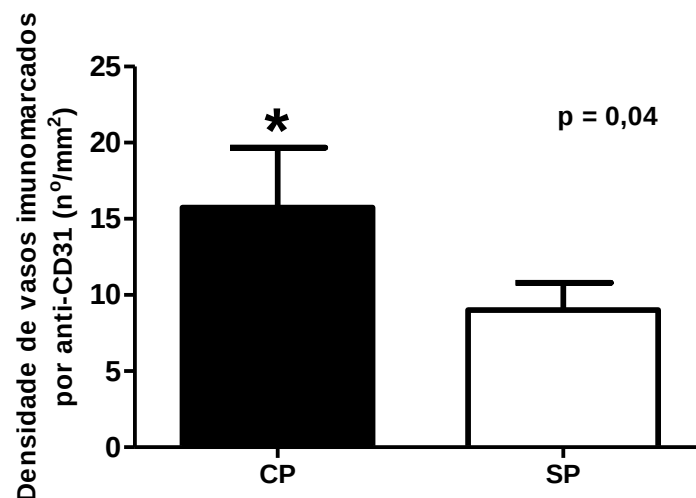
Figura 12 – Densidade de mastócitos imunomarcados por anti-triptase nos grupos CP e SP.



Teste *t Student*; $p = 0,14$. Os valores foram expressos em nº/mm².

No grupo CP foi observado maior densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31 quando comparado ao grupo SP, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 13 – Densidade de vasos sanguíneos imunomarcados por anti-CD31 nos grupos CP e SP.

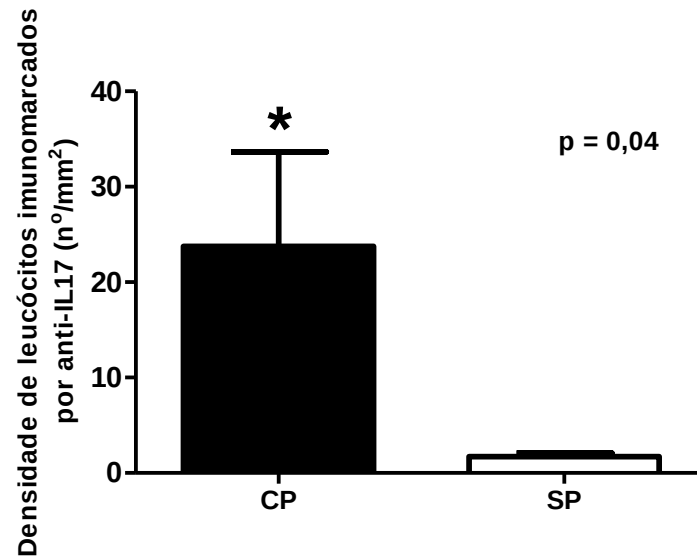


Teste *t Student*; $p = 0,04$. Os valores foram expressos em nº/mm².

* Indica diferença estatisticamente significativa.

No grupo CP foi observada maior densidade de leucócitos imunomarcados por anti-IL-17 quando comparado ao grupo SP, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Figura 14).

Figura 14 – Densidade de leucócitos imunomarcados por IL-17 nos grupos CP e SP.

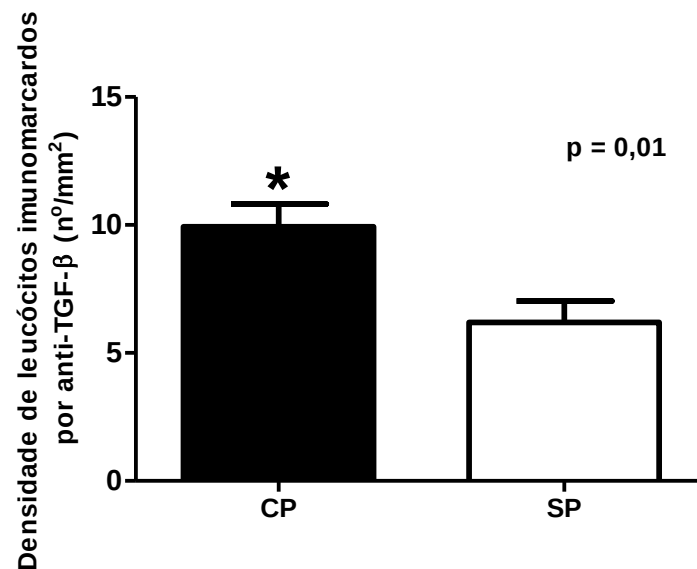


Teste *t Student*; $p = 0,04$. Os valores foram expressos em n°/mm^2 .

* Indica diferença estatisticamente significativa.

No grupo CP foi observada maior densidade de leucócitos imunomarcados por anti- TGF- β quando comparado ao grupo SP, com diferença estatística significativa ($P < 0,05$) (Figura 15).

Figura 15 – Densidade de leucócitos imunomarcados por anti- TGF- β nos grupos CP e SP.

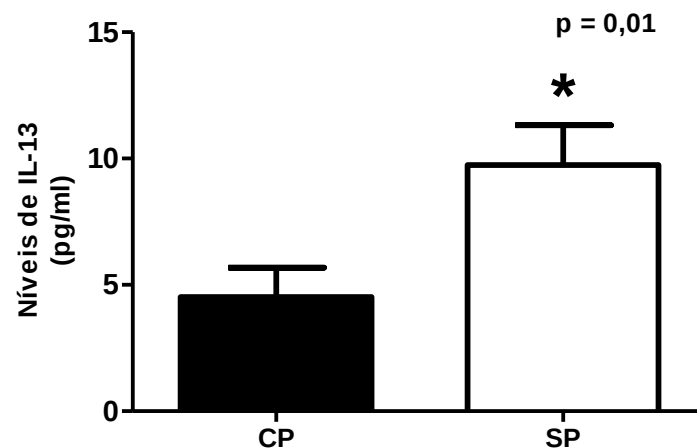


Teste *t Student*; $p = 0,01$.

* Indica diferença estatisticamente significativa.

Os pacientes do grupo SP apresentaram maior expressão de IL-13 ($p = 0,01$) quando comparados aos pacientes do grupo CP (Figura 16).

Figura 16 – Níveis da citocina IL-13 nos grupos CP e SP.

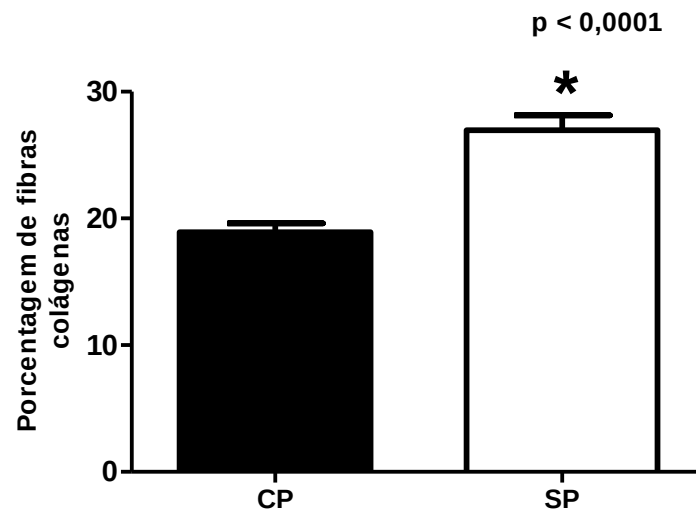


Teste *t Student*; $p = 0,01$. Os valores foram expressos em pg/ml.

* Indica diferença estatisticamente significativa.

Foram encontradas maior porcentagem de fibras colágenas no grupo SP quando comparado ao grupo CP, com diferença significativa ($p < 0,05$) (Figura 17).

Figura 17 – Porcentagem de fibras colágenas nos grupos CP e SP.



Teste *Mann Whitney*; $p < 0,0001$.

* Indica diferença estatisticamente significativa

No grupo CP houve correlação positiva e significativa entre a densidade de mastócito-triptase e a densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31 (Tabela 2) e correlação positiva e significativa entre a densidade de mastócito-quimase e a densidade de vasos imunomarcados por anti-CD31. Houve correlação negativa e significativa entre a densidade de IL-17 e a porcentagem de colágeno (Tabela 2). As demais correlações não apresentaram diferenças significativas. Não observamos necrose em nenhum dos casos analisados.

Tabela 2 – Coeficientes de correlação (valores reais) para periimplantite: IL-17, IL-13, CD31, mastócito-quimase, mastócito-triptase e fibras colágenas.

	IL-13	TGF- β	IL-17	CD31	Mastócito-quimase	Mastócito-triptase
TGF- β	-0.56					
IL-17	0.55	-0.45				
CD31	-0.26	0.69	0.18			
Mastócito-quimase	0.01	-0.09	0.56	0.65*		
Mastócito-triptase	-0.26	0.11	0.07	0.76*	0.59	
Fibras colágenas	-0.29	0.77	-0.66*	-0.4	-0.35	-0.13

* indica correlação significativa; $p < 0.05$

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O acúmulo de biofilme e a contaminação microbiana dos tecidos periimplantares causam inflamação e consequentemente grande exsudação de células inflamatórias (PETKOVIC-CURCIN et al, 2011). Em relação ao padrão inflamatório da doença periimplantar, foi demonstrado neste estudo maior densidade de leucócitos nos tecidos epitelial e conjuntivo, além de maior porcentagem de hemorragia acentuada no grupo CP em relação ao grupo SP. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram aumento da permeabilidade vascular e exsudação de leucócitos, os quais liberam enzimas que causam destruição dos tecidos, incluindo destruição da parede vascular, o que contribui ainda mais para o quadro hemorrágico encontrado no processo inflamatório (ALBOUY et al., 2012; JUNG et al., 2012). Sangramento marginal foi visto apenas no grupo CP. Assim, neste grupo estaria acontecendo lesão vascular e destruição de tecidos causadas por inflamação, o que justificaria maior profundidade de sondagem e sangramento marginal nos pacientes com periimplantite.

Sabe-se que a presença de agentes agressores induz, dentre outros fatores, a liberação de mediadores químicos por mastócitos. A liberação desses mediadores promove inflamação com vasodilatação, recrutamento e adesão de células, remodelamento, fibrose e angiogênese (MALUF et al., 2009). Os mastócitos participam dos processos de remodelação tecidual e fibrose, pois exercem papel relevante na gênese de tecido conjuntivo, incluindo a liberação de mediadores que estimulam a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (GARBUZENKO et al., 2002). Já foi descrito aumento de mastócitos-triptase e de mastócitos-quimase em vários tecidos a nível sistêmico, como na artéria aorta (CZYZEWSKA-BUCZYŃSK; WITKIEWICZ, 2011), em carcinomas renais (WATANABE et al., 2012) e em áreas de calcificação (MAŚLIŃSKA et al., 2010). Embora não tenhamos encontrado estudos sobre mastócitos na periimplantite, já foi demonstrado o envolvimento dessas células na doença periodontal em humanos (BATISTA et al, 2005) e em roedores (HOLZHAUSEN et al, 2011).

Essas células podem participar tanto nos eventos destrutivos como no mecanismo de defesa através da secreção de citocinas, incluindo perpetuação da resposta Th2, migração celular e processos de cura (BATISTA et al, 2005). Estudos anteriores demonstraram maior atividade de triptase no fluido crevicular de pacientes

1 com doença periodontal, fornecendo evidências de que a inibição da triptase poderia
2 impedir o aparecimento da perda óssea alveolar, em um modelo experimental
3 (HOLZHAUSEN et al, 2011). Além disso, os mastócitos apresentam propriedades
4 imunomoduladoras na inflamação, sendo capazes de produzir citocinas e
5 mediadores, aumentando a intensidade da reação inflamatória (OLIVEIRA et al,
6 2004). Assim, como no presente estudo demonstramos tendência para o aumento
7 de mastócitos-triptase e de mastócitos-quimase no grupo CP, acreditamos que estas
8 células estariam envolvidas no processo inflamatório crônico do grupo CP.

9 Ao avaliar os grupos CP e SP conjuntamente verificamos que houve maior
10 densidade de mastócito-triptase em comparação com a densidade de mastócitos-
11 quimase. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram
12 aumento do número de mastócitos-triptase em mucosas (LINDSTEDT et al., 2007).

13 Juntamente com os macrófagos, os mastócitos também liberam TNF- α , que
14 promove a inflamação e ativa o endotélio. Nessa ativação do endotélio, observa-se a
15 maior expressão de CD31, que é uma molécula de adesão presente na membrana
16 endotelial podendo ser utilizada também para avaliar a angiogênese
17 (KRISHNASWAMY et al, 2006). Estudo realizado com ratos *Wistar* demonstrou
18 aumento de CD31 em lesões periapicais (YAMANAKA et al., 2012), o que corrobora
19 nossos resultados, pois encontramos maior densidade de vasos sanguíneos
20 imunomarcados por anti-CD31 em pacientes do grupo CP. Portanto nesse grupo a
21 maior neovascularização durante o processo inflamatório crônico estaria
22 contribuindo para o maior influxo de leucócitos ao local da inflamação,
23 particularmente os linfócitos T efetores.

24 Entre os linfócitos T efetores, aqueles que chegam primeiro ao local da
25 inflamação são as células Th17 que liberam citocinas como a IL-17 (MURPHY et al.,
26 2010). Como muitas citocinas inflamatórias, a IL-17 desempenha papel tanto de
27 proteção como de destruição óssea, sendo importante para a defesa do hospedeiro
28 contra organismos infecciosos (KELLY et al., 2005). Além disso, esta citocina tem
29 sido associada com a patogênese de várias doenças inflamatórias tais como
30 psoríase, artrite reumatóide (MIOSSEC, 2003), doença inflamatória intestinal (SHIH
31 et al., 2008) e lúpus eritematoso sistêmico (CRISPÍN e TSOKOS, 2010). Sabe-se
32 que a IL-17 desempenha papel crítico em várias respostas imunes e inflamatórias
33 através da regulação da expressão de vários mediadores inflamatórios, incluindo
34 citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (PARK; LEE, 2011). Em estudo com

1 fluido crevicular periimplantar, os autores demonstraram que a IL-17 poderia ser
2 responsável pela indução de citocinas pró-inflamatórias (SEVERINO et al., 2011).
3 Outra função importante da IL-17 é a sua capacidade de induzir a ativação das
4 células osteoclásticas (SATO et al., 2006), colaborando para a perda do implante.
5 No presente estudo houve expressão significativamente maior de IL-17 no grupo CP
6 quando comparado ao grupo SP, sugerindo o papel dessa citocina na destruição do
7 tecido periimplantar. Outro aspecto interessante é que a síntese de IL-17 pode ser
8 induzida pela presença combinada de TGF- β e IL-6 (GUTCHER; BECHER, 2007).
9 Como no presente estudo verificamos maior densidade de células imunomarcadas
10 por anti-TGF- β no grupo CP, acreditamos que a densidade mais elevada de IL-17
11 nesse grupo pode ter ocorrido, pelo menos em parte, devido à densidade mais
12 elevada de TGF- β .

13 A maior densidade de células imunomarcadas por anti-TGF- β no grupo CP
14 sugere aumento da atividade pró-inflamatória, com a quimiotaxia de neutrófilos,
15 monócitos e linfócitos, como demonstrado em outro estudo (SUAREZ et al., 2004).

16 Além disso, estudos anteriores demonstraram que o TGF- β aumenta a
17 fibrogênese, o que é importante para a cura que acompanha a inflamação crônica
18 (MORANDINI et al., 2011). Estes estudos contradizem nossos resultados, uma vez
19 que encontramos menor porcentagem de fibras colágenas no grupo CP. Assim,
20 sugerimos que no presente estudo o TGF- β estaria agindo como citocina pró-
21 inflamatória.

22 A neoformação de tecido conjuntivo fibroso está relacionada com várias
23 doenças (PEREIRA et al., 2002; PINHEIRO et al., 2003). Em um estudo com
24 biópsias de tecido periodontal humano, os autores demonstraram maior densidade
25 de infiltrado inflamatório e menor porcentagem de colágeno em doenças
26 periodontais (YOUNES et al., 2009). Portanto esses achados corroboram os
27 resultados apresentados neste estudo, pois observamos um menor percentual de
28 colágeno no grupo CP, que também pode ter ocorrido devido à lise das fibras
29 colágenas por células citotóxicas como já demonstrado na doença periodontal
30 (SÉGUIER, et al., 2000). Além disso, no presente estudo observamos níveis mais
31 baixos de IL-13 no grupo CP. Estudos tem demonstrado que a IL-13 estimula a
32 produção de fibras colágenas em doenças pulmonares (SCOTTON; CHAMBERS,
33 2007) e na esclerose sistêmica (O'REILLY, et al., 2012). Deste modo, nós

acreditamos que a menor expressão de IL-13 observada no grupo CP poderia contribuir para a menor formação de colágeno neste grupo.

Encontramos no presente estudo correlação positiva e significativa entre a densidade de mastócito-triptase e a densidade de vasos sanguíneos imunomarcados por anti-CD31 e entre a densidade de mastócito-quimase e a densidade de vasos sanguíneos imunomarcados por anti-CD31. Assim, sendo CD31 uma molécula de adesão presente em células endoteliais e pelo fato de que os mastócitos liberam mediadores químicos e enzimas que promovem a angiogênese (YAMANAKA et al., 2012), o grande número de mastócitos encontrado no grupo CP justificaria a maior densidade de vasos sanguíneos imunomarcados por anti-CD31 encontrada neste grupo.

No presente estudo, houve uma correlação negativa e significativa entre a densidade de IL-17 e porcentagem de fibras colágenas. A IL-17 desenvolve importante papel na iniciação e manutenção da resposta pró-inflamatória induzindo reabsorção osteoclástica. Portanto, em condições de saúde periimplantar, a IL-13 poderia estar exercendo atividade reguladora e controlar a síntese de IL-17 pelas células T. Entretanto, quando se instala o processo inflamatório, essa regulação não mais ocorreria e a IL-17 passaria a ser secretada em quantidade elevada, promovendo exacerbação da inflamação e destruição tecidual, justificando a menor porcentagem de colágeno encontrado no grupo CP.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Assim, a maior resposta inflamatória no grupo CP sugere a participação de mastócitos-triptase e mastócito-quimase na indução de alterações nas células endoteliais e maior expressão de CD31. Essa indução faz com que ocorra maior exsudação de leucócitos, o que aumentaria outras citocinas como a IL-17, que por sua vez agravaria o processo inflamatório e inibiria a atuação de IL-13. Com a redução de IL-13 no grupo CP, a ação pró-fibrótica neste grupo também estaria reduzida. Além disso, o aumento da IL-17 poderia ativar osteoclastos com a consequente perda de osso, o que poderia provocar a perda de implantes dentários. Dessa forma, a compreensão sobre a influência das citocinas na instalação da periimplantite poderia permitir o desenvolvimento de novas terapias que inibam a síntese de IL-17 e que induzam a síntese de IL-13 no tecido periimplantar, contribuindo assim para aumentar a longevidade dos implantes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2008. 564p.
- ALBOUY, J.P. et al. Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v.39, n.2, p.182-187, 2012.
- ALPAGOT, T. et al. The association between gingival crevicular fluid TGF-beta 1 levels and periodontal status in HIV-1(+) patients. **Journal of Periodontology**, v.79, n.1, p.123-30, 2008.
- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v.106, n.1, p.9-14, 2012.
- ATSUTA, I. et al. Ultrastructural localization of laminin-5 (gamma2 chain) in the rat peri-implant oral mucosa around a titanium-dental implant by immuno-electron microscopy. **Biomaterials**, v.26, n.32, p.6280–6287, 2005.
- BATISTA, A.C.; RODINI, C.O.; LARA, V.S. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. **Oral Diseases**, v.11, n.4, p.249-254, 2005.
- BERGLUNDH, T.; PERSSON, L.; KLINGE, B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. **Journal of Clinical Periodontology**, v.29, n.3, p.197-212, 2002.
- BUDUNELI, N. et al. Evaluation of transforming growth factor-beta 1 level in crevicular fluid of cyclosporin A-treated patients. **Journal of Periodontology**, v.72, n.4, p.526-531, 2001.
- BULLON, P. et al. Immunohistochemical analysis of soft tissues in implants with healthy and peri-implantitis condition, and aggressive periodontitis. **Clinical Oral Implants Research**, v.15, n.5, p.553-559, 2004.
- CARRANZA, F. A. **Periodontia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 832p.
- CHAPLIN, D. D. Overview of the human immune response. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.117, n.2, p.430-435, 2006.
- CHARALAMPAKIS, G. et al. Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicenter study. **Clinical Oral Implants Research**, v.23, n.9, p.1045-1054, 2012.
- CHATTERJEE, S. et al. Quantitative role of mast cells in odontogenic cystic enlargement. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v.7, n.27, p.1162-1665, 2008.

CONSOLARO, A. et al. Saucerization of osseointegrated implants and planning of simultaneous orthodontic clinical cases. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v.15, n.3, p.19-30, 2010.

COSYN, J. et al. The Peri-Implant Sulcus Compared with Internal Implant and Suprastructure Components: A Microbiological Analysis. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v.13, n.4, p.286-295, 2011.

CRISPIN, J.C.; TSOKOS, G.C. Interleukin-17-producing T cells in lupus. **Curr Opin Rheumatol**, v.22, n.5, p.499-503, 2010.

CZYZEWSKA-BUCZYŃSKA, A; WITKIEWICZ, W. Role of mast cells in the pathogenesis of atherosclerosis. **Przegl Lek.** v.68, n.3, p.171-174, 2011.

DUARTE, P. M. et al. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. **Journal of Periodontology**, v.80, n.2, p.234-243, 2009.

FAVA, R. A. et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. **The Journal of Experimental Medicine**, v.173, n.5, p.1121-1132, 1991.

FRANSSON, C. et al. Severity and pattern of periimplantitis – associated bone loss. **Journal of Clinical Periodontology**, v.37, n.5, p.442-448, 2010.

FUSCHIOTTI, P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. **Cytokine**, v.56, n.3, p.544-549, 2011.

GARBUZENKO, E. et al Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. **Clinical and Experimental Allergy**, v.32, n.2, p.237-246, 2002.

GARTNER, L. P.; HIATT, L. J. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 456p.

GONZALES, J. R. et al. Production of interleukin-13 is influenced by the interleukin-4 -34TT and -590TT genotype in patients with aggressive periodontitis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.73, n.2, p.128-134, 2011.

GUALINI, F; BERGLUNDH, T. Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, n.1, p.14-18, 2003.

GUTCHER, I., BECHER, B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.5, p.1119-1127, 2007.

HAUSER-GERSPACH, I. et al. Influence of gaseous ozone in periimplantitis: bactericidal efficacy and cellular response. An in vitro study using titanium and zirconia. **Clinical Oral Investigation**, v.16, n.4, p.1049-1059, 2011.

HEASMAN, P., ESMail, Z., BARCLAY, C. Peri-implant diseases. **Dental Update**, v.37, n.8, p.511-512, 2010.

HEITZ-MAYFIELD, L. J. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. **Journal of Clinical Periodontology**, v.35, n.8, p.292-304, 2008.

HOLZHAUSEN, M., et al. Nafamostat mesilate, a potent tryptase inhibitor, modulates periodontitis in rats. **Clinical Oral Investigation**, v.15, n.6, p.967-973, 2011.

JUNG, S.R. et al. Histological analysis of soft and hard tissues in a periimplantitis Lesion: A Human Case Report. **Implant Dentistry**, v.21, n.3, p.186-189, 2012.

KELLY, M. N. et al. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v.73, n.1, p.617-621, 2005.

KOTAKE, S. et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.103, n.9, p.1345-1352, 1999.

KRISHNASWAMY, G. et al. The human mast cell: an overview. **Methods Mol Biol**, v.315, p.13-34, 2006.

KUMAR, M. et al. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.128, n.5, p.1077-1085, 2011.

LIN, S. K. et al. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor-beta 1 in induced rat periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v.26, n.6, p.335-340, 2000.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1304p.

LINDSTEDT, K.A.; MÄYRÄNPÄÄ, M.I.; KOVANEN, P.T. Mast Cells in vulnerable atherosclerotic plaques- a view to a kill. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.11, n.4, p.739-758, 2007.

LISKMANN, S. et al. Correlation between clinical parameters and interleukin-6 and interleukin-10 levels in saliva from totally edentulous patients with peri-implant disease. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.21, n.4, p.543-550, 2006.

MALUF, L.C.; BARROS, J.A.; MACHADO FILHO, C.D.S. Mastocitose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.213-225, 2009.

MÁRTON, I.J. et al. Distribution of interleukin-2 receptor alpha-chain and cells expressing major histocompatibility complex class II antigen in chronic human periapical lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v.13, n.4, p.259-262, 1998.

MAŚLIŃSKA, D. et al. Association of mast cells with calcification in the human pineal gland. **Folia Neuropathologica**, v.48, n.4, p. 276-282, 2010.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v.449, n.7164, p.819-826, 2007.

MENDONÇA, A.C. et al. Tumor necrosis factor-alpha levels after surgical anti-infective mechanical therapy for peri-implantitis: a 12-month follow-up. **Journal of Periodontology**, v.80, n.4, p.693-699, 2009.

MIOSSEC, P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n.3, p.594- 601, 2003.

MISCH, C. E., et al. Implant success, survival, and failure: the International Congress of Oral Implantologists (ICOI) Pisa Consensus Conference. **Implant Dentistry**, v.17, n.1, p.5-15, 2008.

MORANDINI, A.C. et al. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. **Brazilian Oral Research**, v.25, n.2, p.157-62, 2011.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v.7, p.145-173, 1989.

MURPHY, K. et al. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 885p.

NETTO, J.N.S. et al. Evaluation of mast cells in periapical cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.41, p.630-636, 2012.

OLIVEIRA, C.R. et al. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.97, n.1, p.59-63, 2004.

OPPERMANN, R. V.; GOMES, S. C.; FIORINI, T. Epidemiologia e fatores de risco para as doenças periimplantares. **R. Periodontia**, v.18, n.4, p.14-21, 2008.

O'REILLY, S; HÜGLE, T; VAN LAAR, JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. **Rheumatology (Oxford)**, v.51, n.9, p.1540-1549, 2012

PAGE, R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v.26, p.230-242, 1991.

PARK, J. B.; LEE, Y.C. Replacing a failed implant adjacent to the implant-supported restoration in the anterior region after ridge augmentation procedure. **Gerodontology**, v.28, n.3, p.238-242, 2011.

PEREIRA, S.A. et al. Morphometric study of the spleen in chronic Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Higiene**, v.66, n.4, p.401-403, 2002.

PETKOVIC-CURCIN, A. et al. Cytokines in pathogenesis of peri-implantitis. **Vojnosanit Pregl Journal**, v.39, n.5, p.435-440, 2011.

PINHEIRO, S.W. et al. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.36, n.4, 2003.

REAL-OSUNA, J.; ALMENDROS-MARQUÉS, N.; GAY-ESCODA, C. Prevalence of complications after the oral rehabilitation with implant-supported hybrid prostheses. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.17, n.1, p.116-121, 2012.

REZENDE, C. P. et al. Peri-implantite. **Revista Gaúcha de Odontologia**. v.53, n.4, 2005.

RODINI, C. O.; BATISTA, A.C.; LARA, V.S. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.97, n.1, p.59-63, 2004.

SAINTRAIN, M. V.; DE SOUZA, E. H. Impact of tooth loss on the quality of life. **Gerodontology**, v.29, n.2, p.632-636, 2012.

SALLUM, A. W.; SILVA FILHO, W. L. S.; SALLUM, E. A. Etiopatogenia da doença periimplantar. **R. Periodontia**, v.18, n.4, 2008.

SÁNCHEZ-GARCÉS, M. A.; GAY-ESCODA, C. Periimplantitis. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.9, p.69-74, 2004.

SATO, K. et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. **The Journal of Experimental Medicine**, v.203, n.12, p.2673-2682, 2006.

SCOTTON, C. J.; CHAMBERS, R. C. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. **Chest**. v.132, n.4, p.1311-1321, 2007.

SÉGUIER, S. et al. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. **J Periodontol**, v.71, n.7, p.1079-1085, 2000.

SEVERINO, V. O.; NAPIMOGA, M. H.; DE LIMA PEREIRA, S. A. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluido of patients with peri-implantitis. **Archives of Oral Biology**, v.56, n.8, p. 823-828, 2011.

SHIBLI, J. A. et al. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. **Clinical Oral Implants Research**, v.19, n.10, p.975-82, 2008.

SHIH, D. Q., TARGAN, S. R., MCGOVERN, D. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. **Current Gastroenterology Reports**, v.10, n.6, p.568–575, 2008.

SKALERIC, U. et al. Changes in TGF-beta 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. **European Journal of Oral Sciences**, v.105, n.2, p.136-142, 1997.

STOCKINGER, B.; VELDHOFEN, M. Differentiation and function of Th17 T cells. **Current Opinion in Immunology**, v.19, n.3, p.281-286, 2007.

SUAREZ, L. J. et al. Relative proportions of T-cell subpopulations and cytokines that mediate and regulate the adaptive immune response in patients with aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.75, n.9, p.1209-1215, 2004.

TETÈ, S. et al. Collagen fiber orientation around machined titanium and zirconia dental implant necks: an animal study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.24, n.1, p.52-58, 2009.

WATANABE. et al. High density of tryptase-positive mast cells in patients with renal cell carcinoma on hemodialysis: correlation with expression of stem cell factor and protease activated receptor-2. **Human Pathology**, v.43, n.6, p.888-897, 2012.

YAMANAKA, Y. et al. Expression of angiogenic factors in rat periapical lesions. **Basic Research – Biology**, v.38, n.3, p.313-317, 2012.

YEUNG, S. C. Biological basis for soft tissue management in implant dentistry. **Australian Dental Journal**, v.53, p.39-42, 2008.

YOUNES, R. et al. Pertinent cell population to characterize periodontal disease. **Tissue Cell**, v.41, n. 2, p. 141-150, 2009

ZITZMANN, N. U.; BERGLUNDH, T. Definition and prevalence of peri-implant disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.35, n.8, p.286-291, 2008.

ZURAWKI, G.; VRIES, J. E. Interleukin13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. **Immunology Today**, v.15, n.1, p.19-26, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ANAMNESE



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG

Data: ____/____/____ Prontuário: _____
Nome: _____
Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: ____ Estado civil: ____
Endereço: _____ Bairro: _____
Telefone: _____ (com) _____ celular: _____
Profissão: _____ Raça: _____
Gênero: () masculino () feminino Gravidez: () sim () não
Implantes: _____
Motivo da perda os dentes: _____

1) Sistema cardiovascular

- Pressão arterial: _____ hipertensão arterial () sim () não
- outras cardiopatias (angina, infarto, AVC ou derrame, insuficiência cardíaca congestiva, marcapso cardíaco, endocardite bacteriana, cardiopatia isquêmica, reumática, chagásica, prolapso...)

2) Sistema respiratório (asma, pneumonia, bronquite, enfisema, fibrose...)

() sim () não _____

3) Sistema digestório (gastrites, úlceras...)

() sim () não _____

4) Sistema genito-urinário (cistite, nefrite, insuficiência renal...)

() sim () não _____

5) Sistema endócrino (diabetes, tireoidite, paratireoidismo...)

() sim () não _____

6) Alergias

() sim () não _____

7) Distúrbios hemorrágicos (distúrbios de coagulação, púrpuras...)

() sim () não _____

8) Discrasias sanguíneas (leucemia, agranulocitose...)

() sim () não _____

9) Doenças infecciosas (hepatite, DST, AIDS, tuberculose...)

() sim () não _____

10) Tabagismo

() sim () não Quantos cigarros por dia: _____
() ex-fumante Há quanto tempo não fuma? _____
() fumante passivo _____

11) Sedentarismo () sim () não _____

12) Índice de massa corporal (IMC) = peso / (altura)² - peso = altura =

13) Está sob tratamento médico? () sim () não _____

14) Faz uso de algum medicamento? () sim () não _____

15) Possui alguma neoplasia (tumores)? () sim () não _____

16) Possui alguma doença auto-imune (pênfigo, tireoidite de Hashimoto ...)

() sim () não _____

- 17) Toma algum medicamento com ação imunossupressora?
☐ sim ☐ não _____
- 18) Deficiência de vitamina C? _____ Ingere fontes de vitamina C? _____
- 19) Osteoporose ☐ sim ☐ não _____
- 20) Já teve problemas periodontite antes da colocação do implante? ☐ sim ☐ não
- 21) Se a resposta anterior foi sim: Fez tratamento periodontal?
☐ sim ☐ não quando? _____

22) Condição dental (coroa)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	Índice	Condição
																0	Dente natural
																1	Ausente
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	2	Implante

23) Higienização ☐ satisfatória ☐ deficiente

24) Sangramento à sondagem (somente no implante)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	Índice	Condição
																0	Ausência
																1	Presença
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		

25) Supuração (somente no implante)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	Índice	Condição
																0	Ausência
																1	Presença
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		

26) Profundidade de sondagem (em milímetros) do(s) implante(s):

Implante (dente)	Recessão				Profundidade de sondagem				Sangramento			
	V=	L=	M=	D=	V=	L=	M=	D=	V=	L=	M=	D=
	V=	L=	M=	D=	V=	L=	M=	D=	V=	L=	M=	D=
	V=	L=	M=	D=	V=	L=	M=	D=	V=	L=	M=	D=

Implante (dente)	Tipo de implante	Data do implante	Data do cicatrizador	Data de instalação da prótese sobreimplante

27) Há antagonista ao implante? ☐ sim ☐ não
☐ dente natural ☐ prótese removível ☐ prótese fixa

28) Implante com coroa:

☐ sem coroa ☐ provisória ☐ definitiva Qual material? _____
 Em que condição encontra-se? ☐ satisfatória ☐ insatisfatória

 Assinatura do paciente

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Periimplantite é um termo utilizado para identificar o processo de inflamação que ocorre em torno de um implante dentário. O diagnóstico desta doença é extremamente importante, pois se não for identificada e tratada, pode levar à perda do implante. O presente estudo “*Avaliação da mucosa perimplantar em pacientes com periimplantite utilizando histoquímica, imuno-histoquímica e ELISA*” tem como objetivo avaliar a resposta inflamatória observada em implantes dentários, utilizando métodos laboratoriais (histoquímica, imuno-histoquímica e ELISA) e verificar se essa resposta está aumentada em pacientes fumantes e portadores de diabetes mellitus. Como os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, sua participação é importante. Caso você participe, será necessário fazermos coletas de amostra de tecido gengival (biópsia), exames radiográficos, perguntas sobre sua saúde geral e odontológica. Este estudo permitirá identificar se você tem periimplantite e também lhe oferecerá todo o suporte de informações sobre sua prevenção e tratamento. Não será feito nenhum procedimento que traga risco a sua vida ou maior desconforto, além da remoção do fragmento.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Por sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer/

momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba, ____/____/____

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores: Sanívia: _____ – Marcelo Ribeiro: _____

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854

APÊNDICE C – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Oral Diseases - Manuscript Copy



Evaluation of peri-implant mucosa: clinical, histopathological and immunological aspects

Journal:	<i>Oral Diseases</i>
Manuscript ID:	ODI-12-12-OM-2865
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	17-Dec-2012
Complete List of Authors:	Araujo, Marcia; Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Leao Filho, Antonio; Universidade de Uberaba, Curso de Odontologia Silva, Gabriela; Universidade de Uberaba, Curso de Odontologia Melo, Marcelo; Universidade de Uberaba, Curso de Odontologia Napimoga, Marcelo; São Leopoldo Mandic Institute and Research Center, Laboratory of Immunology and Molecular Biology Rodrigues, Denise; Universidade de Uberaba, Laboratório de Biologia Celular e Molecular Alves, Poliana; Universidade Federal do Triângulo Mineiro, CEFORES de Lima Pereira, Sanívia; Universidade de Uberaba, Laboratório de Biologia Celular e Molecular;
Keywords:	Oral Pathology, Cytokine, Immune response, Inflammation, Peri-implantitis

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**Ministério da Educação**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Av. Frei Paulino, 30 (Centro Educacional e Administrativo da UFTM) – 2º andar, Sala H – Bairro Abadia

38025-180 - Uberaba-MG - TELEFAX: 34-3318-5854

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Projeto denominado AVALIAÇÃO DA MUCOSA PERIIMPLANTAR EM PACIENTES COM PERIIMPLANTITE UTILIZANDO HISTOQUÍMICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E ELISA, de autoria de SANÍVIA APARECIDA L. PEREIRA (pesquisadora responsável), foi protocolado para análise no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro sob o nº 1657 e considerado aprovado em reunião do dia 6/8/2010.

Uberaba, 29 de novembro de 2012.

pl/ 
Maria José Ferreira de Sousa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM